

## 枯草杆菌中性蛋白酶基因在大肠杆菌中的表达

刘白玲\* 何先祺

(四川联合大学皮革工程系 成都 610065)

张义正

(四川联合大学生物工程系 成都 610064)

蛋白酶是枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)产生的具有重要工业价值的水解酶。对蛋白酶基因的分离与高效率表达一直是基因工程研究领域的重要内容之一<sup>[1~4]</sup>。蛋白酶基因的筛选可采用不同的方法,如“免疫法”、“DNA 杂交法”、“遗传互补法”等。大肠杆菌(*Escherichia coli*)是基因工程中最常用的宿主菌,若能以 *E. coli* 作为筛选蛋白酶基因的宿主菌,那么使用 *E. coli* 的常规载体,便可直接获得完整的蛋白酶基因。枯草杆菌的蛋白酶基因能否在大肠杆菌中表达,则是实现这一目标的关键。Koide 等人<sup>[5]</sup>报道过枯草杆菌的胞内丝氨酸蛋白酶基因在大肠杆菌中的表达,转化细胞在含有脱脂牛奶的平板上可产生十分微弱的水解圈。Ikemura 等人<sup>[6]</sup>将 Subtilisin E(枯草杆菌蛋白酶 E)插入大肠杆菌的表达载体,具有活性的 Subtilisin E 便可分泌到大肠杆菌的细胞周质中。吴汝平撰文指出<sup>[7]</sup>,克隆的枯草杆菌蛋白酶基因不能在大肠杆菌中表达,是因为大肠杆菌不能转录枯草杆菌的促使生长调节基因。Wang 等人<sup>[8]</sup>则认为,在大肠杆菌中观察不到野生型的中性蛋白酶基因 *E(nprE)* 的表达,是因为 *nprE* 的表达产物对大肠杆菌有致死作用,除去该基因上的核糖体结合位点, *nprE* 便能在大肠杆菌中低水平表达,并能将表达产物分泌至胞外。

由上可知,枯草杆菌的蛋白酶基因能否在大肠杆菌中表达以及表达的位置仍然是一个众说纷纭的问题,这一问题也正是能否用大肠杆菌作为宿主菌筛选蛋白酶基因的关键。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌株与质粒:

*E. coli* DH5  $\alpha$  F'<sup>[9]</sup>(F', end A1, hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>-</sup>), supE44, thi-1,  $\lambda$ <sup>-</sup>, relA1,

gyrA, recA1,  $\phi$  80d lacZ  $\Delta$  M15,  $\Delta$  (lacZYA-argF)u 169)

*E. coli* JM107<sup>[10]</sup>(endA1, gyr96, thi, hsdR17, supE44, relA1,  $\lambda$ <sup>-</sup>,

$\Delta$ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>ZAM15])

pNPR10<sup>[4]</sup>(6.6kb, Cm<sup>r</sup>, npr<sup>+</sup>), 为 *B. subtilis* ~ *E. coli* 穿梭载体, 由 pBS42 与完整的枯草杆菌 *nprE* 基因(包括 *nprE* 调节基因、启动子、SD 序列、pre-pro 序列及 *nprE* 结构基因、终止子)组建而成。

1.1.2 培养基: LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10g, 酵母浸膏 5g, NaCl 10g, pH 7.0~7.2; LM 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10g, 酵母浸膏 5g, NaCl 0.58g, MgSO<sub>4</sub> 2.46g, pH7.0, 其中含酪蛋白时可用于检测转化子能否产生蛋白水解圈; SOB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 20g, 酵母浸膏 5g, NaCl 0.58g, KCl 0.38g, 100x 镁离子

国家教委年轻教师基金项目。

\* 现在地址: 四川联合大学(成都科技大学)高分子研究所, 成都 610065。

本文于 1996 年 4 月 12 日收到。

母液\* (每 100ml 中含  $MgCl_2 \cdot 2H_2O$  33g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  24.65g) 10ml, pH 7.0; SOC 培养基 (SOB 培养基中含 20mmol/L 葡萄糖)。

1.1.3 分子克隆工具酶: EcoR I, Hind III, Klenow fragment, T4 DNA 连接酶, 购自华美生物工程公司。

1.1.4 核苷酸混合物 dNTP, 购自华美生物工程公司。

1.1.5 细胞裂解液, 由缓冲液、溶菌酶、盐酸胍、Triton X-100 等按文献[11]配制。

缓冲液 (50mmol/L Tris. HCl, 5mmol/L  $CaCl_2$ , pH7.5); 裂解液 A: 缓冲液中含 1mg/ml 溶菌酶; 裂解液 B: 缓冲液中含 0.25% Triton X-100; 裂解液 C: 缓冲液中含 0.2 mol/L 盐酸胍; 裂解液 D: 缓冲液中含 1mg/ml 溶菌酶, 0.25% Triton X-100; 裂解液 E: 缓冲液中含 0.2mol/L 盐酸胍, 0.25% Triton X-100。

## 1.2 方法

1.2.1 pNPR10 转化 *E. coli* DH5  $\alpha$  F': 采用标准转化法<sup>[12]</sup>。

1.2.2 pNPR10 的缺失及片段的回收: 采用低熔点琼脂糖法<sup>[13]</sup>。

1.2.3 pNPR10 和  $\Delta$ pNPR10 的转化细胞的裂解: 采用“菌落原位裂解法”<sup>[11]</sup>。将 *E. coli* DH5 $\alpha$  F' (pNPR10), *E. coli* DH5 $\alpha$  F' ( $\Delta$ pNPR10) 转化细胞培养液稀释后涂布在含有氯霉素 (20 $\mu$ g/ml) 的 LB 平板上, 培养 12~16h。待菌落大小为 0.5~0.7mm 时, 用灭菌滤纸影印菌落, 然后将影印有菌落的滤纸移至新鲜的 LB 平板上, 菌落向上, 于 37 $^{\circ}C$  培养 3~5h 至菌落大小为 1mm 左右。在一平皿中放置两层滤纸, 用裂解液充分润湿, 再将长有菌落的滤纸平移到裂解皿内, 于室温下裂解 1~1.5h。除去裂解液后, 将其平移至含有 0.75% 酪蛋白的 LB 平板上, 于 37 $^{\circ}C$  培养 8~12h。

1.2.4 蛋白酶活性分析<sup>[14]</sup>: 转化细胞培养至对数期, 用 5ml A、B、C、D、E 5 种裂解液分别处理由 50ml 培养液可获得的转化细胞, 室温下缓缓摇动 4h。离心后取上清液 0.5ml, 加入 1.5 ml 缓冲液, 于 37 $^{\circ}C$  保温 10min, 然后加入 1ml 保温在 37 $^{\circ}C$  的 1% 的酪蛋白溶液 (用 50mmol/L Tris. HCl 配制, pH7.5) 中, 于 37 $^{\circ}C$  保温 5min。加入 3ml 终止反应液 (0.1 mol/L 三氯乙酸-0.22mol/L 醋酸钠-0.33 mol/L 醋酸), 剧烈混合后置室温下 30min, 离心取上清液分析蛋白酶活性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 pNPR10 对 *E. coli* 的转化

Wang 等人的研究指出, 含有完整的枯草杆菌中性蛋白酶基因的重组质粒不能在 *E. coli* 中表达<sup>[8]</sup>。但来自嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的中性蛋白酶基因 M (nprM) 却可在 *E. coli* 中表达, 表达产物还可以分泌至胞外<sup>[15]</sup>。为比较含有和不含有枯草杆菌蛋白酶基因的重组质粒对 *E. coli* 细胞的转化效果, 对 pNPR10 中的蛋白酶基因编码区按图 2 所示流程进行缺失。缺失部分包括 nprE 的调节基因、pre-pro 序列及 85% 的 nprE 结构基因 (约 1400bp), 从而获得了中性蛋白酶基因的缺失突变体, 命名为  $\Delta$ pNPR10。用  $\Delta$ pNPR10 和 pNPR10 分别转化 *E. coli* 细胞, 均获成功 (图 3)。这一结果说明, 完整的枯草杆菌蛋白酶基因不影响重组质粒对 *E. coli* 的转化效果。将 pNPR10 转化细胞涂布在含有酪蛋白的 LB 氯霉素抗性平板上, 培养 24h 以上, 菌落周围无水解圈, 说明表达的蛋白酶不能分泌到细胞外。

### 2.2 转化细胞的蛋白酶活性检测

pNPR10 转化细胞在 LB+酪蛋白的抗性平板上没有产生水解圈, 有两种可能: 一是枯草杆菌的中性蛋白酶基因没有在 *E. coli* 中表达; 二是基因表达了, 但表达产物不能被分泌到胞外。Tsukagoshi 等

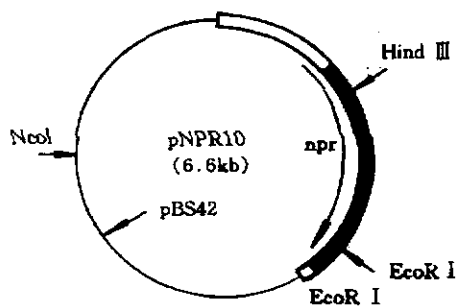


图1 pNPR10 的物理图谱

人<sup>[12]</sup>曾采用“菌落原位裂解法”成功地研究了热稳定性  $\alpha$  淀粉酶基因在 *E. coli* 中的克隆及表达问题。本文按照 Tsukagoshi 的方法, 将 pNPR10 转化细胞影印在滤纸上, 恢复培养后用裂解液处理, 然后平移倒置于 LB+酪蛋白或仅含酪蛋白的琼脂平板上, 于 37℃ 培养 8h, 可看到形状不规则的水解圈。若用 1% 的鞣酸液处理, 便可明显地看到因酪蛋白被水解而产生的水解圈(图 4)。

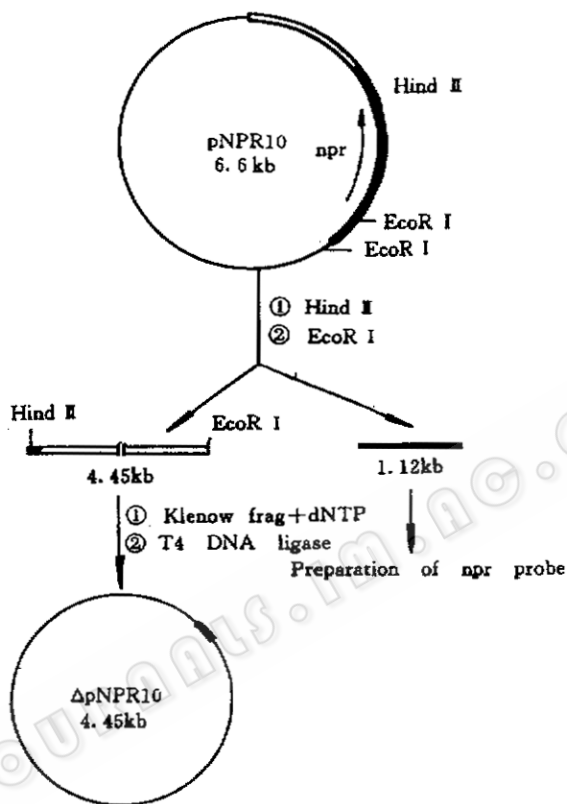


图 2 pNPR10 的制备

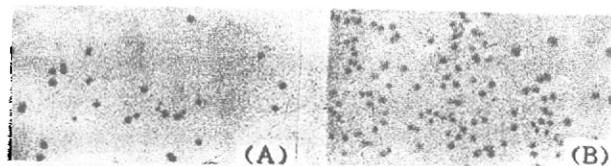


图 3 *E. coli* DH5αF' (ΔpNPR10) (A) 和 *E. coli* DH5αF' (pNPR10) (B) 转化细胞

可见, 转化细胞中存在着蛋白酶活性, 但此酶并没有被分泌到胞外, 而是存在于 *E. coli* DH5αF' 的细胞内部。研究中对 *E. coli* DH5αF' (ΔpNPR10) 转化细胞同样采用了上述的方法进行检测, 在含有酪蛋白的检测平板上未观测到水解现象。以 *E. coli* JM107 为宿主菌, 用 pNPR10 和 ΔpNPR10 转化 *E. coli* JM107, 所得结果与 *E. coli* DH5αF' 相同。

### 2.3 枯草杆菌中性蛋白酶在 *E. coli* 细胞中的位置

枯草杆菌中性蛋白酶基因的表达产物在枯草杆菌中是一外分泌蛋白, 该基因上有一段为分泌信号

肽编码的 DNA 序列<sup>[16]</sup>。上述结果已表明,该基因可以在 *E. coli* 中表达。如果它编码的信号肽能在 *E. coli* 中起作用,便可引导蛋白酶进入 *E. coli* 的细胞周质中;否则,蛋白酶就存在于细胞质中。采用细胞裂解<sup>[12]</sup>、增加细胞壁通透性<sup>[17]</sup>等方法对 pNPR10 转化细胞进行处理,可确定中性蛋白酶在 *E. coli* 中存在的位置。将 50ml 的转化细胞培养液离心后,细胞分别悬浮于 5ml 各种不同的细胞裂解液中,处理完毕后离心取上清液分析蛋白酶活性,结果列于表 1。

表 1 *E. coli* DH5αF'(pNPR10)转化细胞  
在不同处理液中的蛋白酶活性

Lytic solution	Protease activity/u. ml <sup>-1</sup>	
	<i>E. coli</i> DH5αF'	<i>E. coli</i> DH5αF'(pNPR10)
Main buffer	0	0
A	0	0.5
B	0	5.0
C	0	1.0
D	0	1.5
E	0	1.1

\* 来自 1ml *E. coli* DH5αF'(pNPR10)转化细胞

由表 1 可知, *E. coli* DH5αF' 和未经裂解液处理的 *E. coli* DH5αF'(pNPR10)转化细胞的培养物上清液中均无蛋白酶活性。说明 *E. coli* DH5αF' 本身没有蛋白酶活性,未裂解的 *E. coli* DH5αF'(pNPR10)转化细胞则因 *nprE* 基因的表达产物没有被分泌至胞外,也没有

检测到蛋白酶活性。用溶菌酶(裂解液 A)或盐酸胍(裂解液 C)处理 *E. coli* DH5αF'(pNPR10)转化细胞,所测得的蛋白酶活性分别为 0.5 和 1.0u/ml。由于溶菌酶可以去除细胞壁,盐酸胍可以改变细胞壁通透性,因而测得的蛋白酶活性主要来自存在于细胞周质中的蛋白酶。Triton X-100 是非离子型的表面活性剂,主要作用于细胞质膜,对细胞外膜也有一定的作用,有利于细胞质中蛋白质的释放。因而用 Triton X-100 (裂解液 B)处理转化细胞后,酶活性陡然增至 5u/ml,说明在 *E. coli* DH5αF'(pNPR10)转化细胞的细胞周质中有一定量的蛋白酶存在,但蛋白酶主要存在于细胞质中。

Naglak<sup>[17]</sup>指出, Triton X-100 与盐酸胍相结合处理细胞,具有协同作用,可大大促进细胞内蛋白质的释放。本研究中 Triton X-100 与盐酸胍或溶菌酶的共同使用反而导致了蛋白酶活性的降低,这种差别也许与两个研究中不同的目标酶有关。Naglak 在研究中以 β-内酰胺酶作为标准,本研究则以中性蛋白酶为标准。

本研究结果是:未经任何缺失处理的、完整的中性蛋白酶基因是可以在大肠杆菌中表达的。带有完整的枯草杆菌中性蛋白酶基因的重组质粒 pNPR10 与去除了大部分中性蛋白酶基因的缺失突变质粒 ΔpNPR10 一样,具有对大肠杆菌的可转化性,但基因的表达产物并没有被分泌到胞外,而是主要存在于大肠杆菌中的细胞质中,部分存在于大肠杆菌的细胞周质中。这也许是因为枯草杆菌的中性蛋白酶基因所编码的信号肽在大肠杆菌中功能不强,使合成的蛋白酶不能及时地分泌到细胞周质中。假如这一推论是正确的,那么就可以解释 Wang 等人的研究中,为什么在 *E. coli* 中观察不到具有完整的中性蛋白酶基因的表达产物,或得不到稳定的转化细胞的现象。因为所合成的蛋白酶不能及时地被输送出细胞质,蛋白酶的大量积累影响了宿主菌的生理过程,从而导致了细胞的死亡。

本研究还表明,若采用 *E. coli* 作为宿主菌克隆目的基因,适当的检测方法十分重要。对转化细胞进行细胞壁裂解,或改变细胞壁及细胞膜的通透性,以释放出其中的目标蛋白,对以 *E. coli* 为宿主菌进行基因克隆具有关键作用。

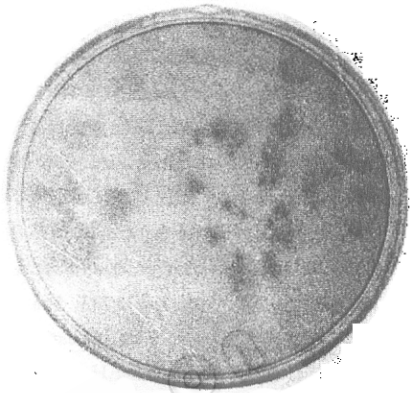


图 4 由裂解的 *E. coli* DH5αF'(pNPR10) 细胞所产生的蛋白水解圈

致 谢 作者衷心感谢美国加利福尼亚大学生物化学系的 Yang M Y 博士赠送 pNPR10 质粒。

### 参 考 文 献

- [1] Rufo G A, Sullivan B J, Sloma A *et al.* J Bacteriol, 1972;1019~1023.
- [2] Sloma A, Roddph C F, Rufo G A *et al.* J Bacteriol, 1990, 172:1024~1029.
- [3] Wong S-L, Price C W, Doldfarb D S *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81:1184~1188.
- [4] Yang M Y, Ferrari U, Henner D J. J Bacteriol, 1984, 160:15~21.
- [5] Koide Y, Nakamura A, Uozumi T *et al.* J Bacteriol, 1986, 167:110~116.
- [6] Ikemura H, Takagi H, Inouye M, J Biol Chem, 1987, 262:7859~7864.
- [7] 杨开宇, 孟广震. 基因表达调控与生物技术中的酶学, 北京: 科学出版社, 1990, 69~198.
- [8] Wang L F, Ekkel S M, Devenish R J. J Biochem International, 1990, 22:1085~1093.
- [9] Liss L r. Focus, 1989, 9(3):13.
- [10] Hitzerman R A, Hagie F E, Levine H L *et al.* Nature, 1981, 293:717~722.
- [11] Tsukagoshi N, Ihara H, Yamagata H *et al.* Mol Gen Genet, 1984, 193:58~63.
- [12] Hanahan D J. Mol Biol, 1983, 166:557~580.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, Cold Spring Harbor. New York.
- [14] Fujii M, Takagi M, Imanaka T *et al.* J Bacteriol, 1983, 154:831~837.
- [15] Yamada M, Kubo M, Miyake T. Gene, 1991, 99:109~114.
- [16] Vasantha N, Thompson L D, Rhodes C *et al.* J Bacteriol, 1984, 159:811~819.
- [17] Naglak T J, Wang H Y, Enzyme Microb Technol, 1990, 12:603~611.

## Study on the Expression of Cloned Neutral Protease Gene of *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*

Liu Bailing He Xianqi

(Department of Leather Engineering, Sichuan Union University, Chengdu 610065)

Zhang Yizheng

(Department of Biotechnology, Sichuan Union University, Chengdu 610064)

**Abstract** An *Escherichia coli*-*Bacillus subtilis* shuttle vector pNPR10 containing a neutral protease (*nprE*) gene of *B. subtilis* was used to transform the *E. coli* DH5aF' and *E. coli* JM107 for study of the expression of *npr* gene of *B. subtilis* in *E. coli* and its expression level. The purpose of the research was to develop a method of screening *npr* gene with *E. coli* as a host. The results indicated that the intact *npr* gene of *B. subtilis* could be expressed in *E. coli* and the expressed neutral protease was mainly distributed in the cytoplasm and partially in periplasmic space of *E. coli*. The *E. coli* could be the host for the isolation of *npr* gene if the colony lysis in situ was used.

**Key words** *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, neutral protease gene, gene cloning, gene expression